控制摄食对小鼠肝脏及肾上腺胆固醇代谢的影响[1]

钱宏梁　潘志强*　王晓敏　卢　涛　方肇勤

（上海中医药大学基础医学院，上海 201203）

摘　要：本试验旨在研究控制摄食对小鼠肝脏及肾上腺胆固醇代谢的影响。采用雄性 ICR 小鼠为试验对象，先适应性饲养 3 d，在体重达 24~25 g 后，随机分为 5 组，每组 6 只，分别为正常对照组（自由摄食）、摄食 4.0 g 组[摄食量：4.0 g/（只 • d）；控食比例：正常摄食量的 88%]、摄食 3.0 g 组[摄食量：3.0 g（只 • d）；控食比例：正常摄食量的 66%]、摄食 2.0 g 组[摄食量：2.0 g（只 • d）；控食比例：正常摄食量的 44%]和摄食 1.5 g 组[摄食量：1.5 g（只 • d）；控食比例：正常摄食量的 22%]。各组自由饮水，控食 14 d 后处死小鼠，取心脏、肝脏、肾脏、脾脏、胸腺及睾丸称重并计算脏器指数，取肝脏和肾上腺组织分别抽提总 RNA 和总蛋白，以实时荧光定量 PCR 技术检测胆固醇代谢相关基因 mRNA 的相对表达量，以 Western blot 方法检测类固醇合成急性调节蛋白（StAR）蛋白的相对表达量，并以 ELISA 方法检测血清皮质酮含量。结果表明：1）与正常对照组相比，各控食组小鼠体重均有不同程度的减轻，心脏、肝脏、肾脏、脾脏、胸腺均有不同程度的萎缩。2）与正常对照组相比，摄食 3.0 g 组、摄食 2.0 g 组和摄食 1.5 g 组小鼠肝脏低密度脂蛋白受体(*Ldlr*)、B 类清道夫受体 1(*Scarb*1)、羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(*Hmgcr*)、激素敏感脂酶（*Lipe*）、载脂蛋白 E(*Apoe*)、ATP 结合盒转运体 G5（*Abcg*5）、ATP 结合盒转运体 G8（*Abcg*8）、细胞色素 P450 家族成员 7A1(*Cyp*7*a*1)、固醇调节元件结合蛋白*裂解激活蛋白*（*Scap*）、肝脏 X 受体β（*Nr1h*2）、过氧化物酶体增殖剂激活受体α(*Ppara*)、过氧化物酶体增殖剂激活受体γ(*Pparg*)基因的表达均显著上调（$P<0.05$ 或 $P<0.01$），而胰岛素诱导基因 2（*Insig*2）基因的表达则显著下调（$P<0.05$）。3）与正常对照组相比，摄食 2.0 g 组和摄食 1.5 g 组小鼠肾上腺细胞色素 P450 家族成员 11A1（*Cyp*11*a*1）、细胞色素 P450 家族成员 21A1(*Cyp*21*a*1)基因的表达均显著上调（$P<0.05$），摄食 1.5 g 组小鼠肾上腺 *StAR* 和细胞色素 P450 家族成员 11B1(*Cyp*11*b*1)基因的表达也显著上调（$P<0.05$），而摄食 3.0 g 组、摄食 2.0 g 组和摄食 1.5 g 组细胞色素 P450 家族

收稿日期：2017-11-16
基金项目：国家自然科学基金面上项目（81473562）
作者简介：钱宏梁（1992-），男，浙江桐乡人，硕士研究生，从事中医证候实验研究。E-mail：QHL2826@163.com
*通信作者：潘志强，教授，硕士生导师，E-mail： pzq527@163.com

成员11B2(*Cyp*11*b*2)基因的表达显著下调（P＜0.05）。此外，与正常对照组比较，各控食组小鼠肾上腺StAR蛋白表达均增强且随着摄食量的降低而增强。由此可见，严格控制摄食会影响小鼠免疫器官脾脏与胸腺，同时代谢器官肝脏也受到严重影响，进而影响胆固醇在肝脏与肾上腺的代谢与转化。

关键词：控制摄食；小鼠；肝脏；肾上腺；胆固醇代谢

中图分类号：R589.2　　　文献标识码：A　　文章编号：

随着社会的经济发展，人民生活水平不断提高饮食日益丰富，但过量摄食容易导致代谢类疾病；同样，摄食不足也将引起机体代谢异常。两千多年前的《内经》强调“饮食有节，谨和五味”的思想，已经意识到饮食必须有规律、需节制，不食或少食不利于健康，暴饮多食也有损健康。大量的文献报道认为肥胖症、糖尿病、高血压等许多慢性疾病与饮食有明确的关系[1-3]，因此，许多健康或亚健康人群有意控制每日饮食量，部分肥胖人群为了减轻体重更是大幅度限制饮食量。然而，控制饮食对机体是否有损害的报道较少。基于长期饮食不足容易导致机体营养失衡、消瘦、虚劳等病症，以及部分疾病如食管癌、胃癌、厌食症等因饮食摄入不足，引起机体代谢异常，也会引发中医类似气虚证、脾胃虚弱证，甚至阴阳两虚证等[4]，其中，中医气虚证或脾胃虚弱证与肝脏功能关系密切，中医肾虚证或阴阳两虚证与肾上腺功能有关，然而肝脏与肾上腺重要的共性生化特征均是胆固醇代谢的场所。胆固醇在肝脏代谢为胆汁酸，以促进脂类的消化吸收与抑制胆固醇在胆汁中析出沉淀，防止结石形成，有助于阐明中医脾胃功能；胆固醇在肾上腺代谢转化为类固醇激素，参与机体各种应激反应，涉及中医肾藏象的部分功能。因而，探索摄食不足对机体代谢的影响有助于认识中医脾肾虚证发生的可能物质基础，尤其有助于阐明大幅控制饮食对机体哪些脏器影响最大。本研究以小鼠为试验对象，通过设计不同梯度摄食量，比较与寻找导致机体代谢异常的控食量临界点以及对脏器影响的强度，并深入研究控食后小鼠胆固醇代谢的异常机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物以及饲料

试验动物为ICR小鼠，无特定病原（SPF）级，雄性，6～8周龄，体重18～20 g，30只，购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司，饲养于上海中医药大学实验动物中心SPF级

动物房，动物许可证号：SCXK（沪）2013-0016，动物合格证编号：2008001672050。

试验用转基因鼠基础饲料（货号 1010011）购自江苏省协同医药生物工程有限责任公司，其组成及营养水平见表 1。

表 1　基础饲粮组成及营养水平（风干基础）

Table 1　Composition and nutrient levels of the basal diet （air-dry basis）　%

项目 Items	含量 Content
原料 Ingredients	
玉米 Corn	52.40
小麦 Wheat	10.00
次粉 Wheat middling	10.00
豆粕 Soybean meal	10.00
鱼粉 Fish meal	5.00
鸡肉粉 Chicken powder	5.00
石粉 Limestone	1.20
色拉油 Salad oil	2.40
预混料 Premix	4.00
合计 Total	100.00
营养水平 Nutrient levels[1)]	
粗纤维 CF	3.3
粗蛋白质 CP	19.2
粗脂肪 EE	6.6
水分 Moisture	9.9
粗灰分 Ash	5.8
总磷 TP	0.85
钙 Ca	1.11
其他 Others[2)]	见表注

1) 营养水平为实测值。Nutrient levels were measured values.

2) 其他包含 Others contained the following:天门冬氨酸 Asp 1.74%，苏氨酸 Thr 1.05%，丝氨酸 Ser 1.06%，谷氨酸 Glu 3.44%；脯氨酸 1.67%，甘氨酸 Gly 1.32%，丙氨酸 Ala 1.29%；半胱氨酸 Cys 0.36%，缬氨酸 Val 0.94%，蛋氨酸 Met 0.70%，异亮氨酸 Ile 1.18%，亮氨酸 Leu 1.75%；酪氨酸 Tyr 0.76%，苯丙氨酸 Phe 0.92%，赖氨酸 Lys 1.42%，组氨酸 His 0.56%，精氨酸 Arg 1.30%，色氨酸 Trp 0.26%，Cu 16 mg/kg，Fe 323 mg/kg，Mg 2.16×10^3 mg/kg，Mn 162 mg/kg，K 7.84×10^3 mg/kg，Na 2.24×10^3 mg/kg，Zn 140 mg/kg，I 1.08 mg/kg，Se 0.37 mg/kg，VA 2.57×10^4 IU/kg，VD_3 4.36×10^3 IU/kg，VE 195 IU/kg，VK_3 20.7 mg/kg，VB_1 85.1 mg/kg，VB_2 18.9 mg/kg，VB_6 169 mg/kg，烟酸 nicotinic acid 88 mg/kg，泛酸 pantothenic acid 3.67×10^4 μg/kg，叶酸 folic acid 5.52×10^3 μg/kg，生物素 biotin 388 μg/kg，VB_{12} 28.6 ng/kg，胆碱 choline 1.84×10^3 mg/kg。

1.1.2 药物与试剂

RIPA 裂解液和化学发光（ECL）试剂盒购自上海碧云天生物试剂有限公司，兔多抗类固醇合成急性调节蛋白（StAR）购自 Abcam 公司，小鼠β-肌动蛋白（β-actin）抗体购自 Sigma-Aldrich 公司。Trizol 试剂盒购自 Invitrogen 公司；PrimeScript® RT Reagent Kit、SYBR® Premix Ex Taq™ (TliRNaseH Plus) II 购自 TaKaRa 公司；采用 Primer 3（v.0.4.0）在线软件设计引物并委托 Life Technologies 公司合成。小鼠皮质酮酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒购自美国 Cayman 公司。

1.1.3 试验设备

Eco-illumina 实时荧光定量 PCR 仪（美国 illumina 公司）、Elx800 型酶标仪（Biotek 公司）、Eppendorf 台式离心机（5417R 型）等。

1.2 方法

1.2.1 试验设计

小鼠适应性饲养 3 d，当体重达 24~25 g 后，随机分为 5 组，每组 6 只，分别是正常对照组（自由摄食）、摄食 4.0 g 组[摄食量：4.0 g/（只·d）；控食比例：正常摄食量的 88%]、摄食 3.0 g 组[摄食量：3.0 g（只·d）；控食比例：正常摄食量的 66%]、摄食 2.0 g 组[摄食量：2.0 g（只·d）；控食比例：正常摄食量的 44%]和摄食 1.5 g 组[摄食量：1.5 g（只·d）；

控食比例：正常摄食量的 22%]。试验开始后，正常对照组给予 100 g 饲粮，置于笼具饲粮投放位置，令其自由摄食，24 h 后称量剩余的饲粮量，然后再补充至 100 g；4 个控食组则精确称量设定的 24 h 摄食量的饲粮，分别为 24、18、12、9 g，置于笼具饲粮投放位置，并于 24 h 后再补充饲粮（补充饲量时，各控食组前 1 天饲粮均被摄取完）；每日重复上述饲喂方式，共进行 14 d。试验过程中小鼠自由饮水，每隔 1 d 称量体重，并观察记录小鼠精神状态等信息。

1.2.2 样品采集

在第 15 天处死各组小鼠，取材方法如下：1）摘眼球取血，分离血清，-20 ℃保存，用于皮质酮含量检测；2）分别摘取心脏、胸腺、肝脏、脾脏、肾脏（双侧）、睾丸（双侧）称重（以 g 表示），并计算脏器指数，以脏器质量（g）与体重（g）的比值表示；3）取肾上腺，抽提总 RNA，检测β-actin、*StAR*、细胞色素 P450 家族成员 11A1（*Cyp*11*a*1）、细胞色素 P450 家族成员 21A1(*Cyp*21*a*1)、细胞色素 P450 家族成员 11B1(*Cyp*11*b*1)、细胞色素 P450 家族成员 11B2(*Cyp*11*b*2)等基因 mRNA 相对表达量；4）抽提肾上腺总蛋白，检测 StAR 蛋白相对表达量；5）取肝脏，抽提总 RNA，检测β-actin、载脂蛋白 A1（*Apoa*1）、载脂蛋白 E(*Apoe*)、ATP 结合盒转运体 A1（*Abca*1）、ATP 结合盒转运体 G1(*Abcg*1)、细胞色素 P450 家族成员 7A1(*Cyp*7*a*1)、羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(*Hmgcr*)、低密度脂蛋白受体(*Ldlr*)、肝脏 X 受体α(*Nr*1*h*3 或 *LXRα*)、肝脏 X 受体β（*Nr1h*2 或 *LXRβ*)、过氧化物酶体增殖剂激活受体α(*Ppara* 或 *PPARα*)、过氧化物酶体增殖剂激活受体γ(*Pparg* 或 *PPARγ*)、B 类清道夫受体 1(*Scarb*1 或 *SRB*1)、固醇调节因子结合蛋白 1(*Srebf*1 或 *SREBP*1)、固醇调节因子结合蛋白 2(*Srebf*2 或 *SREBP2*)、3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 合成酶 1（*Hmgcs*1）、酯酰辅酶 A:胆固醇酰基转移酶 1（*Acat*1）、激素敏感脂酶（*Lipe*）、ATP 结合盒转运体 G5（*Abcg*5）、ATP 结合盒转运体 G8（*Abcg*8）、固醇调节元件结合蛋白裂解激活蛋白（*Scap*）、胰岛素诱导基因 1（*Insig*1）、胰岛素诱导基因 2（*Insig*2）等胆固醇代谢类基因 mRNA 相对表达量。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 检测基因 mRNA 表达量

上、下游引物序列采用 Primer 3(v.0.4.0)在线软件合成，委托 Life Technologies 公司上海合成部完成。按照 Trizol 试剂盒说明书抽提肝脏与肾上腺总 RNA；逆转录反应体系 20 μL，反应程序为 37 ℃×15 min，85 ℃×5 s，4 ℃；PCR 扩增反应体系为 20 μL，反应程序为 95 ℃

×3 min，95 ℃×30 s，60 ℃×30 s，40 个循环。目的基因 mRNA 相对表达量分析方法：，以正常对照组作为空白对照，以β-actin 基因 Ct 均值作为内参对照，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算目的基因 mRNA 相对表达量：

$\Delta Ct = Ct_{目的基因} - Ct_{内参基因}$；

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{控食组} - \Delta Ct_{正常对照组}$；

目的基因 mRNA 相对表达量$=2^{-\Delta\Delta Ct}$。

式中：*Ct* 为扩增 *n* 个循环基因的荧光数值。

表 2　肝脏胆固醇代谢相关基因引物序列

Table 2　Primer sequences of genes related cholesterol metabolism in liver

基因名称 Gene name	GeneBank 登录号 GeneBank accession No.	引物序列 Primer sequences	产物长度 Product length/bp
β-actin	NM_007393	上游：5′-TGTTACCAACTGGGACGACA-3′	165
		下游：5′-GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA-3′	
*Abca*1	NM_013454	上游：5′-AACAGTTTGTGGCCCTTTTG-3′	157
		下游：5′-AGTTCCAGGCTGGGGTACTT-3′	
*Abcg*1	NM_009593	上游：5′-GAAGTGGCATCAGGGGAGTA-3′	124
		下游：5′-AAAGAAACGGGTTCACATCG-3′	
*Abcg*5	NM_031884	上游：5′-TCACTTGCATTTGCTTCCTG-3′	218
		下游：5′-CTTCTGCTGGCATGATTTGA-3′	
*Abcg*8	NM_026180	上游：5′-CCAGGAATCCTCATTCTGGA-3′	236
		下游：5′-TGGCCAATGGATGTGAAGTA-3′	
*Acat*1	NM_144784	上游：5′-TATTTCCACTCCATGCACCA-3′	133
		下游：5′-ATTGGACATGCTCTCCATCC-3′	
*Apoa*1	NM_009692	上游：5′-TATGTGGATGCGGTCAAAGA-3′	119
		下游：5′-ACGGTTGAACCCAGAGTGTC-3′	
Apoe	NM_001305819	上游：5′-AACAGACCCAGCAAATACGC-3′	149

		下游：5′-GGTGATGATGGGGTTGGTAG-3′	
*Cyp7a*1	NM_007824	上游：5′-ACACCATTCCTGCAACCTTC-3′	232
		下游：5′-GCTGTCCGGATATTCAAGGA-3′	
Hmgcr	NM_008255	上游：5′-TGGAGATCATGTGCTGCTTC-3′	248
		下游：5′-GCGACTATGAGCGTGAACAA-3′	
*Hmgcs*1	NM_001291439	上游：5′-TTTGATGCAGCTGTTTGAGG-3′	198
		下游：5′-CCACCTGTAGGTCTGGCATT-3′	
*Insig*1	NM_153526	上游：5′-ACCTGGGAGAACCACACAAG-3′	178
		下游：5′-CTTCGGGAACGATCAAATGT-3′	
*Insig*2	NM_133748	上游：5′-CTGGGAAGCCACATTTTGTT-3′	132
		下游：5′-TTCACACTCTGGCTGGTGAC-3′	
Ldlr	NM_001252658	上游：5′-TCCTGGAGATGTGATGGACA-3′	158
		下游：5′-GAGCCATCTAGGCAATCTCG-3′	
Lipe	NM_010719	上游：5′-AGACACCAGCCAACGGATAC-3′	239
		下游：5′-ATCACCCTCGAAGAAGAGCA-3′	
*Nr*1*h*2	NM_001285517	上游：5′-ATTAAGGAAGAGGGGCAGGA-3′	198
		下游：5′- GCTGAGCACGTTGTAGTGGA-3′	
*Nr*1*h*3	NM_001177730	上游：5′-GCAGGACCAGCTCCAAGTAG-3′	125
		下游：5′-GGCTCACCAGCTTCATTAGC-3′	
Ppara	NM_001113418	上游：5′-ATGCCAGTACTGCCGTTTTC-3′	220
		下游：5′-GGCCTTGACCTTGTTCATGT-3′	
Pparg	NM_001127330	上游：5′-TTTTCAAGGGTGCCAGTTTC-3′	198
		下游：5′-AATCCTTGGCCCTCTGAGAT-3′	
Scap	NM_001001144	上游：5′-CCAGGAGTTCTGCCTCTTTG-3′	232
		下游：5′-TTGCAATGTGATGGTGTGTG-3′	
*Scarb*1	NM_001205082	上游：5′-AAGTGGTCAACCCAAACGAG-3′	121
		下游：5′-ACGGTGTCGTTGTCATTGAA-3′	

*Srebf*1	NM_001313979	上游：5′-GATCAAAGAGGAGCCAGTGC-3′	191
		下游：5′-TAGATGGTGGCTGCTGAGTG-3′	
*Srebf*2	NM_033218	上游：5′-GGATCCTCCCAAAGAAGGAG-3′	147
		下游：5′-TTCCTCAGAACGCCAGACTT-3′	

β-actin：β-肌动蛋白；*Abca*1：ATP 结合盒转运体 A1 ATP-binding cassette transporter A1；*Abcg*1：ATP 结合盒转运体 G1 ATP-binding cassette transporter G1；*Abcg*5：ATP 结合盒转运体 G5 ATP-binding cassette transporter G5；ATP 结合盒转运体 G8 *Abcg*8 ATP-binding cassette transporter G8；*Acat*1：酯酰辅酶 A:胆固醇酰基转移酶 1 acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferases 1；*Apoa*1：载脂蛋白 A1 apolipoprotein A1；*Apoe*：载脂蛋白 E apolipoprotein E；*Cyp*7*a*1：细胞色素 P450 家族成员 7A1 cytochromes P450 7A1；*Hmgcr*：羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 hydroxymethyl glutaric acyl coenzyme A reductase；*Hmgcs*1：3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 合成酶 1 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase 1；*Insig*1：胰岛素诱导基因 1 insulin induced gene 1；*Insig*2：胰岛素诱导基因 2 insulin induced gene 2；*Ldlr*：低密度脂蛋白受体 low-density lipoprotein receptor；*Lipe*：激素敏感脂酶 hormone-sensitive triglayceride lipase；*Nr*1*h*3：肝脏 X 受体α liver X receptor α；*Nr*1*h*2：肝脏 X 受体β liver X receptor β；*Ppara*：过氧化物酶体增殖剂激活受体α peroxisome proliferators-activated receptor α；*Pparg*：过氧化物酶体增殖剂激活受体γ peroxisome proliferators-activated receptor γ；*Scap*：固醇调节元件结合蛋白裂解激活蛋白 sterol regulatory element binding protein cleavage active protein；*Scarb*1：B 类清道夫受体 1 scavenger receptor class B member 1；*Srebf*1：固醇调节因子结合蛋白 1 sterol regulatory element binding protein 1；*Srebf*2：固醇调节因子结合蛋白 2 sterol regulatory element binding protein 2。

表 5 至表 10 同 The same as Table 5 to Table 10。

表 3 肾上腺胆固醇代谢相关基因引物序列

Table 3 Primer sequences of genes related cholesterol metabolism in adrenal gland

基因名称 Gene name	GeneBank 登录号	引物序列 Primer sequences	产物长度 Product

	GeneBank accession No.		length/bp
β-actin	NM_007393	上游：5′-TGTTACCAACTGGGACGACA-3′ 下游：5′-GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA-3′	165
*Cyp*11*a*1	NM_019779	上游：5′-ACTTCCGGTACTTGGGCTTT-3′ 下游：5′-GCTTGAGAGGCTGGAAGTTG-3′	201
*Cyp*11*b*1	NM_001033229	上游：5′-GTATCGAGAGCTGGCAGAGG-3′ 下游：5′-GGGTTGATGTCGTGTCAGTG-3′	140
*Cyp*11*b*2	NM_009991	上游：5′-CTGAACGCTATATGCCTCAGC-3′ 下游：5′-AGTGTCTCCACCTGGAAGGTT-3′	160
*Cyp*21*a*1	NM_009995	上游：5′-CTCCGGCTATGACATCCCTA-3′ 下游：5′-ACAGCCAAAGGATGGTGTTC-3′	151
StAR	NM_011485	上游：5′-TTGGGCATACTCAACAACCA-3′ 下游：5′-GAAACACCTTGCCCACATCT-3′	103

β-actin：β-肌动蛋白；*Cyp*11*a*1：细胞色素 P450 家族成员 11A1 cytochromes P450 11A1；*Cyp*11*b*1：细胞色素 P450 家族成员 11B1 cytochromes P450 11B1；*Cyp*11*b*2：细胞色素 P450 家族成员 11B2 cytochromes P450 11B2；*Cyp*21*a*1：细胞色素 P450 家族成员 21A1 cytochromes P45021A1；*StAR*：类固醇合成急性调节蛋白 steroidogenic acute regulatory protein。表 11 同 The same as Table 11。

1.2.4 Western blot 检测 StAR 蛋白相对表达量

采用 RIPA 裂解液处理组织，收集总蛋白样品并予以定量，通过变性处理，依次执行聚丙烯凝胶电泳、转膜、封闭、一抗孵育、洗涤、二抗孵育、再洗涤、显影等流程，其中，一抗内参β-actin 以 1:20 000 稀释、StAR 抗体以 1:2 000 稀释。以β-actin 作为内参，分析 StAR 蛋白相对表达量。

1.2.5 ELISA 检测血清皮质酮含量

使用试验小鼠血清原液，依据小鼠皮质酮 ELISA 试剂盒说明书进行操作，检测血清皮质酮含量。

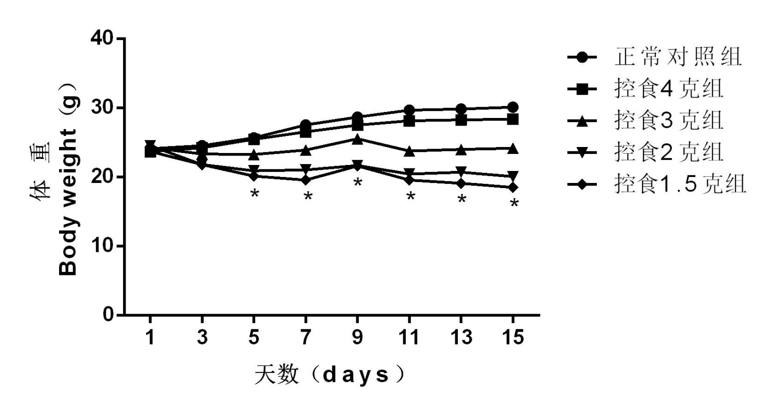
1.3 数据分析

采用 graphPad.Prism5.0 专业软件进行作图及统计分析，其中，体重分析采用重复测量（repeated measurement）方法统计，仅分析各控食组与正常对照组的差异；各脏器质量及其脏器指数均采用单因素方差分析（one-way ANOVA）进行统计分析，P<0.05 表示差异在统计学上具有显著性意义。

2 结果与分析

2.1 各组小鼠体重动态变化

正常对照组小鼠体重缓慢增长，至第 15 天体重增长至 30 g。与正常对照组比较，在各个时间点摄食 4.0 g 组小鼠体重均略下降，但差异均不显著（P>0.05）；然而，从第 5 天起，摄食 3.0 g 组、摄食 2.0 g 组和摄食 1.5 g 组小鼠体重显著下降（P<0.05），且体重下降与摄食量有一定相关性。结果提示，3.0 g/（只 • d）甚至更低的摄食量将引起小鼠体重的下降。



数据点标注"*"表示与正常对照组相比差异显著（P<0.05）。

Date points with "*" indicated significant difference compared with normal control group (P<0.05).

图 1 各组小鼠体重变化比较

Fig1 Comparison of body weight changes of mice among groups

2.2 小鼠脏器质量与脏器指数变化

2.2.1 心脏质量与心脏指数变化

由表 4 可知，与正常对照组比较，各控食组小鼠心脏质量显著下降（P<0.05、P<0.01 或 P<0.001），且随摄食量的降低逐渐降低；然而，各控食组小鼠心脏指数均无显著变化（P>0.05），提示控食后小鼠心脏质量随体重同步下降。

2.2.2 肝脏质量与肝脏指数变化

由表 4 可知，与正常对照组比较，各控食组小鼠肝脏质量显著下降（P<0.05），尤其以摄食量在 3.0 g/（只 • d）及以下的各组最显著（P<0.001），此时且肝脏指数也显著下降（P

＜0.001），提示控食后小鼠肝脏萎缩最明显，可能与肝脏是机体重要的代谢器官有关。

2.2.3 肾脏质量与肾脏指数变化

由表 4 可知，与正常对照组比较，各控食组小鼠肾脏质量显著下降（P＜0.05 或 P＜0.001），尤其以摄食量在 3.0 g/（只·d）及以下的各组最显著（P＜0.001），且摄食 3.0 g 组、摄食 2.0 g 组小鼠肾脏指数也显著下降（P＜0.05），提示控食后小鼠肾脏也明显萎缩。

2.2.4 脾脏质量与脾脏指数变化

由表 4 可知，与正常对照组比较，摄食量在 3.0 g/（只·d）及以下的各组小鼠脾脏质量显著下降（P＜0.001），且脾脏指数也有所下降，其中摄食 2.0 g 组降低显著（P＜0.05），提示摄食量在 3.0 g/（只·d）及以下的小鼠脾脏明显萎缩且相比体重萎缩更明显。

2.2.5 胸腺质量与脾脏指数变化

由表 4 可知，与正常对照组比较，摄食量在 3.0 g/（只·d）及以下的各组小鼠胸腺质量显著下降（P＜0.01 或 P＜0.001），且胸腺指数也有所下降，其中摄食 1.5 g 组降低显著（P＜0.05），提示摄食量在 3.0 g/（只·d）及以下的小鼠胸腺与脾脏类似，也出现明显萎缩，其免疫功能下降。

2.2.6 睾丸质量与睾丸指数变化

由表 4 可知，与正常对照组比较，各控食组小鼠睾丸质量下降不显著（P>0.05），且摄食 2.0 g 组和摄食 1.5 g 组的睾丸指数还显著升高（P＜0.01 或 P＜0.001），这说明相对体重变化而言，小鼠睾丸没有明显萎缩情况，同时还因小鼠体重下降导致睾丸指数相对升高，提示控食对小鼠睾丸无明显影响。

总之，严格控制摄食对机体免疫器官脾脏与胸腺的影响最大，其次是代谢器官肝脏与肾脏，而对睾丸的影响最小。

表 4　小鼠脏器质量及脏器指数变化

Table 4　Changes of viscera qualities and viscera indexes of mice

	组别 Groups				
项目 Items	正常对照组 Normal control group	摄食 4.0 g 组 4.0 g feeding group	摄食 3.0 g 组 3.0 g feeding group	摄食 2.0 g 组 2.0 g feeding group	摄食 1.5 g 组 1.5 g feeding group

心脏质量	0.142±0.012	0.122±0.003*	0.114±0.016**	0.098±0.011***	0.082±0.012***
Heart quality					
心脏指数	0.005±0.001	0.004±0.001	0.005±0.001	0.005±0.001	0.005±0.001
Cardiac index					
肝脏质量	1.677±0.150	1.518±0.149*	0.958±0.065***	0.824±0.057***	0.736±0.068***
Liver quality					
肝脏指数	0.055±0.003	0.053±0.005	0.039±0.002***	0.040±0.003***	0.041±0.001***
Hepatic index					
肾脏质量	0.460±0.017	0.420±0.042*	0.316±0.025***	0.267±0.015***	0.249±0.028***
Kidney quality					
肾脏指数	0.015±0.001	0.015±0.002	0.013±0.001*	0.013±0.001*	0.014±0.001
Kidney index					
脾脏质量	0.109±0.016	0.105±0.017	0.067±0.006***	0.042±0.012***	0.041±0.011***
Spleen quality					
脾脏指数	0.004±0.001	0.004±0.001	0.003±0.001	0.002±0.001**	0.002±0.001
Spleen index					
胸腺质量	0.057±0.010	0.056±0.007	0.038±0.007**	0.032±0.012***	0.016±0.006***
Thymus quality					
胸腺指数	0.002±0.001	0.002±0.001	0.002±0.001	0.002±0.001	0.001±0.001**
Thymus index					
睾丸质量	0.211±0.024	0.175±0.024	0.195±0.014	0.185±0.016	0.192±0.023
Testis quality					
睾丸指数	0.007±0.001	0.006±0.001	0.008±0.001	0.009±0.001**	0.011±0.001***
Testis index					

“*”、“**”、“***”均表示与正常对照组相比差异显著，但它们的 P 值分别为<0.05、<0.01、<0.001。下表同。

“*”, “**” and “***” all indicated significant difference compared with normal control group, but the

P-values of them were <0.05, <0.01 and <0.001, respectively. The same as below.

2.3 肝脏胆固醇代谢不同过程相关基因表达变化

2.3.1 胆固醇摄取过程

由表 5 可知，与正常对照组比较，摄食量在 3.0 g/（只 •d）及以下的各组 *Ldlr* 和 *Scarb*1 基因的表达均显著上调（*P*＜0.05）。由于低密度脂蛋白受体（LDLR，其基因名为 *Ldlr*）和 B 类清道夫受体 1（SRB1，其基因名为 *Scarb*1）是肝脏细胞摄入胆固醇的重要受体，此结果提示，严格控制摄食后，吸收入血液中的胆固醇含量下降，小鼠肝细胞 *Ldlr* 基因的表达代偿性上调，以促进肝细胞摄入血液胆固醇。

表 5　肝脏胆固醇摄取过程相关基因表达变化

Table 5　Related gene expression changes in liver cholesterol uptake process

项目 Items	组别 Groups				
	正常对照组 Normal control group	摄食 4.0 g 组 4.0 g feeding group	摄食 3.0 g 组 3.0 g feeding group	摄食 2.0 g 组 2.0 g feeding group	摄食 1.5 g 组 1.5 g feeding group
Ldlr	1.00±0.30	0.78±0.11	1.79±0.33*	2.51±0.47*	2.06±0.36*
*Scarb*1	1.00±0.25	1.36±0.14	1.87±0.39*	1.90±0.38*	1.75±0.38*

2.3.2 胆固醇合成过程

由表 6 可知，与正常对照组比较，摄食量在 3.0 g/（只 • d）及以下的各组 *Hmgcr* 基因的表达均显著上调（*P*＜0.05 或 *P*＜0.01），而 *Hmgcs*1 基因的表达无显著变化（*P*>0.05）。由于羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶（HMGCR，其基因名为 *Hmgcr*）参与细胞内胆固醇的自身合成过程，此结果提示，控制摄食后，小鼠肝细胞通过促进 *Hmgcr* 基因表达上调，以促进肝细胞合成胆固醇。

表 6　肝脏胆固醇合成过程相关基因表达变化

Table 6　Related gene expression changes in liver cholesterol synthesis process

项目 Items	组别 Groups				
	正常对照组 Normal control	摄食 4.0 g 组 4.0 g feeding	摄食 3.0 g 组 3.0 g feeding	摄食 2.0 g 组 2.0 g feeding	摄食 1.5 g 组 1.5 g feeding

	group	group	group	group	group
Hmgcr	1.00±0.32	1.01±0.48	2.55±0.92*	5.63±2.42**	9.00±3.93**
*Hmgcs*1	1.00±0.13	1.33±0.06	0.92±0.19	1.65±0.88	1.60±0.65

2.3.3 胆固醇储存过程

由表 7 可知，与正常对照组比较，摄食 3.0 g 组和摄食 2.0 g 组 *Lipe* 基因的表达显著上调（$P<0.05$），而促进酯化的 *Acat*1 基因的表达无显著变化（$P>0.05$）。这提示，控制摄食后，小鼠肝细胞通过上调 *Lipe* 基因表达，以促进肝细胞内脂滴内酯化的胆固醇转化为游离胆固醇，供细胞所需以弥补胆固醇摄入不足。

表 7　肝脏胆固醇储存过程相关基因表达变化

Table 7　Related gene expression changes in liver cholesterol storage process

	组别 groups				
项目 Items	正常对照组 Normal control group	摄食 4.0 g 组 4.0 g feeding group	摄食 3.0 g 组 3.0 g feeding group	摄食 2.0 g 组 2.0 g feeding group	摄食 1.5 g 组 1.5 g feeding group
*Acat*1	1.00±0.19	0.83±0.11	1.06±0.20	1.05±0.17	0.79±0.22
Lipe	1.00±0.15	1.34±0.11	2.41±0.29*	2.52±0.24*	1.34±0.26

2.3.4 胆固醇流出过程

由表 8 可知，与正常对照组比较，摄食 4.0 g 组 *Apoe*、*Abcg*5 和 *Abcg*8 基因的表达并没有显著变化（$P>0.05$），然而，摄食量在 3.0 g/（只 • d）及以下的各组上述基因的表达均显著上调（$P<0.05$），同时各控食组 *Apoa*1、*Abca*1 和 *Abcg*1 基因的表达均无显著变化（$P>0.05$）。这提示，严格控食后小鼠肝脏胆固醇流出增加，体现肝细胞代谢活跃。

表 8　肝脏胆固醇流出过程相关基因表达变化

Table 8　Related gene expression changes in liver cholesterol outflow process

	组别 Groups				
项目 Items	正常对照组 Normal control group	摄食 4.0 g 组 4.0 g feeding group	摄食 3.0 g 组 3.0 g feeding group	摄食 2.0 g 组 2.0 g feeding group	摄食 1.5 g 组 1.5 g feeding group

*Abca*1	1.00±0.20	1.02±0.24	1.18±0.20	1.14±0.06	0.88±0.15
*Abcg*1	1.00±0.18	0.70±0.23	1.13±0.27	1.38±0.30	1.29±0.19
*Abcg*5	1.00±0.49	1.31±0.48	2.29±0.14*	3.67±0.58**	3.76±0.37**
*Abcg*8	1.00±0.38	1.37±0.06	2.39±0.38*	2.49±0.33*	2.16±0.23*
*Apoa*1	1.00±0.21	1.03±0.30	1.23±0.59	1.01±0.20	1.14±0.26
Apoe	1.00±0.27	1.45±0.47	1.70±0.53*	1.82±0.39*	2.21±0.81*

2.3.5 胆固醇代谢转化过程

由表 9 可知，与正常对照组比较，除摄食 4.0 g 组 *Cyp7a*1 基因的表达无显著变化（P>0.05）外，其他控食组小鼠肝脏 *Cyp7a*1 和 *Scap* 基因的表达均显著上调（P＜0.05 或 P＜0.01）。这提示，控食后加快了小鼠肝脏胆固醇代谢为胆汁酸的过程。

表 9　肝脏胆固醇代谢转化过程相关基因表达变化

Table 9　Related gene expression changes in liver cholesterol metabolism

项目 Items	组别 Groups				
	正常对照组 Normal control group	摄食 4.0 g 组 4.0 g feeding group	摄食 3.0 g 组 3.0 g feeding group	摄食 2.0 g 组 2.0 g feeding group	摄食 1.5 g 组 1.5 g feeding group
*Cyp7a*1	1.00±0.33	2.16±1.29	6.73±3.17*	12.43±3.94**	20.87±4.05**
Scap	1.00±0.13	1.93±0.17*	2.02±0.11*	2.69±0.35*	2.08±0.59*

2.3.6 胆固醇稳态

由表 10 可知，与正常对照组比较，摄食量在 3.0 g/（只 •d）及以下的各组 *Nr*1*h*2、*Ppara*、*Pparg* 基因的表达均显著上调（P＜0.05），*Insig*2 基因的表达显著下调（P＜0.05），而各组 *Nr*1*h*3、*Srebf*1、*Srebf*2 和 *Insig*1 基因的表达则无显著变化（P>0.05）。这提示，控制摄食后小鼠调节肝脏胆固醇合成与代谢的肝脏 X 受体β（LXRβ，基因符号为 *Nr*1*h*2)、过氧化物酶体增殖剂激活受体α(PPARα，基因符号为 *Ppara*)、过氧化物酶体增殖剂激活受体γ(PPARγ，基因符号为 *Pparg*)被激活，以调节胆固醇的稳态平衡。

表 10　肝脏胆固醇稳态相关基因表达变化

Table 10　Related gene expression changes in liver cholesterol homeostasis

项目 Items	正常对照组 Normal control group	摄食 4.0 g 组 4.0 g feeding group	摄食 3.0 g 组 3.0 g feeding group	摄食 2.0 g 组 2.0 g feeding group	摄食 1.5 g 组 1.5 g feeding group
	组别 Groups				
*Nr*1*h*2	1.00±0.23	1.05±0.10	1.57±0.28*	1.78±0.18*	1.40±0.21*
*Nr*1*h*3	1.00±0.17	1.15±0.29	1.35±0.60	1.06±0.15	1.33±0.38
Ppara	1.00±0.36	1.18±0.42	2.92±0.83*	2.75±0.46*	2.52±1.01*
Pparg	1.00±0.29	1.92±1.38	2.65±0.59*	2.50±0.71*	3.30±1.49*
*Srebf*1	1.00±0.08	0.65±0.32	1.11±0.23	1.46±0.40	0.66±0.11
*Srebf*2	1.00±0.16	1.00±0.08	1.20±0.39	1.35±0.21	1.33±0.33
*Insig*1	1.00±0.23	0.57±0.04	1.03±0.21	1.56±0.29	1.79±0.82
*Insig*2	1.00±0.24	0.91±0.19	0.32±0.07*	0.20±0.04*	0.24±0.06*

综合上述结果可知，控制摄食尤其是大比例限食后对小鼠肝脏胆固醇合成和代谢类基因的表达具有一定的影响，同时小鼠肝脏细胞也具有自我纠正细胞内外胆固醇稳态平衡的功能。

2.4 肾上腺皮质细胞胆固醇转化为皮质激素过程重要基因表达变化

由表 11 可知，与正常对照组比较，摄食 2.0 g 组和摄食 1.5 g 组 *Cyp*11*a*1、*Cyp*21*a*1 基因的表达均显著上调（P＜0.05），摄食 1.5 g 组 *StAR* 和 *Cyp*11*b*1 基因的表达均显著上调（P＜0.05），且摄食 3.0 g 组、摄食 2.0 g 组和摄食 1.5 g 组 *Cyp*11*b*2 基因的表达显著下调（P＜0.05）。由于 StAR 和 Cyp11a1 是肾上腺皮质细胞中胆固醇转化为孕烯醇酮的关键限速酶，Cyp21a1 和 Cyp11b1 是皮质激素合成的方向酶，这提示，严格控制摄食后小鼠肾上腺可增强胆固醇的转化用于合成皮质激素以适应外界的应激反应；而 Cyp11b2 是醛固酮合成的关键酶，*Cyp*11*b*2 基因表达下调提示小鼠严格控食后水钠代谢失衡。

表 11 肾上腺皮质细胞胆固醇转化为皮质激素过程重要基因表达变化

Table 11 Important gene expression changes in the process of adrenal cortical cells cholesterol converted into corticosteroids

项目	组别 Groups

Items	正常对照组 Normal control group	摄食 4.0 g 组 4.0 g feeding group	摄食 3.0 g 组 3.0 g feeding group	摄食 2.0 g 组 2.0 g feeding group	摄食 1.5 g 组 1.5 g feeding group
StAR	1.00±0.17	0.90±0.21	0.98±0.14	1.16±0.35	1.39±0.22*
*Cyp*11*a*1	1.00±0.28	1.10±0.42	1.03±0.20	1.69±0.54*	1.57±0.21*
*Cyp*21*a*1	1.00±0.17	1.00±0.26	1.29±0.29	3.51±0.21*	3.27±0.21*
*Cyp*11*b*1	1.00±0.16	0.85±0.13	0.77±0.13	1.16±0.05	1.35±0.18*
*Cyp*11*b*2	1.00±0.16	0.68±0.07	0.49±0.27*	0.45±0.13*	0.40±0.13*

2.5 肾上腺 StAR 蛋白表达变化

由图 2 可知，与正常对照组比较，各控食组小鼠肾上腺 StAR 蛋白表达均增强且与控食程度有关，随着摄食量的降低而增强，提示控食后小鼠肾上腺 StAR 蛋白呈现代偿性表达，以促进胆固醇转化合成类固醇激素。

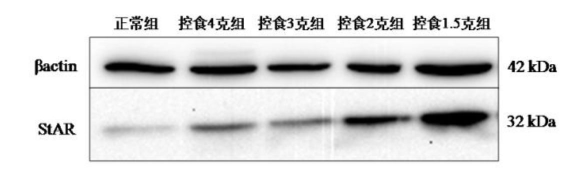


图 2　各组小鼠肾上腺 StAR 蛋白表达比较

Fig.2　Comparison of StAR protein expression in adrenal gland of mice among groups

2.6 控食对小鼠血清皮质酮分泌的影响

由图 3 可知，与正常对照组比较，摄食 4.0 g 组、摄食 3.0 g 组小鼠血清皮质酮含量略有下降，而摄食 1.5 g 组小鼠血清皮质酮含量几乎无变化，各控食组与正常对照组相比均无显著差异（*P*>0.05）。

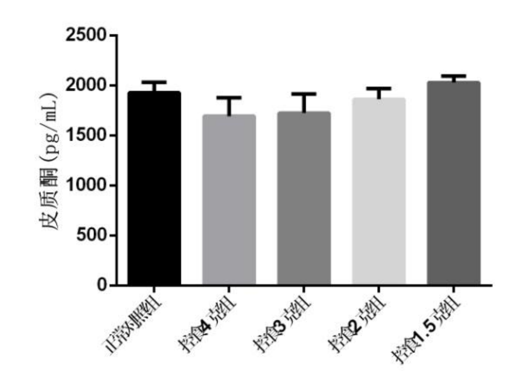


图 3　各组小鼠血清皮质酮含量比较

Fig.3　Comparison of serum corticosterone content of mice among groups

3 讨 论

3.1 控制摄食对小鼠体重、主要脏器的影响

食物是哺乳动物机体最基本的需求，长期的摄食不足必将引起机体代谢异常，导致消瘦甚至恶液质样变化。早在《内经》就有"饮入于胃，游溢精气，上输于脾，脾气散精，上归于肺，通调入道，下输膀胱。水精四布，五经并行。合于四时五脏阴阳，揆度以为常也（《素问·经脉别论》）。"的描述[5]，体现了祖国医学对饮食入胃后其精气复杂的转化与传输过程的认识和高度总括。由此可见，由于饮食摄入不足必将影响机体脏腑功能的正常发挥，在临床上一些患者因控制饮食致厌食或被动不能进食，日久消瘦，机体出现明显的代谢异常表现。从治疗学角度考虑，补充摄食量足以纠正机体代谢失常，然而，摄食量减少后机体代谢发生哪些异常、控制摄食量比例多少对机体代谢影响最小，这是研究者所关心的问题。在一定比例之内的控制摄食对身体各项功能有许多正面作用，陈国芳等[6]报道控制摄食改善代谢指标的分子机制涉及多个方面。首先，控制摄食过程中体内酮体水平增加，适度升高的β-羟丁酸能够通过增强抗氧化应激因子叉头蛋白 O3A（FOXO3A）和金属硫蛋白 2（MT2）的活性，保护细胞免受氧化应激损害。其次，控制摄食后体内的瘦素水平降低，瘦素抵抗得到改善；同时，胰岛素样生长因子 1（IGF-1）的水平下降，而 IGF-1/胰岛素信号通路下调与控制摄食的抗衰老、抗肿瘤、延长寿命作用密切相关。

本试验结果表明，对于体重约 25 g 的 ICR 雄性小鼠，正常对照组小鼠 24 h 自由摄食量通常为 4~5 g，平均约为 4.5 g（摄食量约占体重的 18%），按照正常摄食量的 88%[4.0 g/（只 •d），摄食量约占体重的 16%]给食后，小鼠体重及其脏器轻度缩小；按照正常摄食量的 66%[3.0 g/（只 • d），摄食量约占体重 12%]给食后，小鼠体重、心脏、肝脏、肾脏、脾脏及胸腺均明显萎缩；而按照正常摄食量的 44%[2.0 g/（只 •d），摄食量约占体重 8%]及 33%[1.5 g/（只 •d），摄食量约占体重的 6%]给食后，小鼠体重及其脏器萎缩更加明显。该结果提示，2/3 的正常摄食量可能是一个重要的临界点，一旦控食比例超过正常摄食量 2/3 以上，首要损害的是脾脏、胸腺与肝脏，其次是心脏和肾脏，而对性腺组织睾丸的影响最小。谢德娟[7]研究发现，高营养可提高雄果蝇的精子束数量，加强生殖细胞的分裂，增加精巢的体积，进而提高雄果蝇的生殖能力，而限食则与其相反，导致雄果蝇生殖能力降低，但两者在老龄时都加速了生殖系统衰老状态的产生；此外，限食可通过降低雄果蝇的生殖能力而延长寿命，高营养则增

强了雄果蝇的生殖能力从而使寿命降低，提示了生存与生殖间存在着物质、能量分配与平衡。从本次试验发现各控食组小鼠的日常活跃度明显高于正常对照组小鼠，生殖器官的质量没有明显下降，提示生殖功能不受控制摄食的影响。

3.2 控制摄食对小鼠肝脏胆固醇代谢的影响

胆固醇又称胆甾醇，广泛存在于动物体内，胆固醇在动物体内代谢情况对生物机体的生长、生殖各方面有重要生物学意义。胆固醇摄入的不足和过度都会影响生物机体的正常活动，本试验结果表明，按照正常摄食量66%以上比例[1.5~3.0 g/（只•d）]给食后，小鼠肝脏 *Ldlr*、*Scarb1*、*Hmgcr*、*Lipe*、*Apoe*、*Abcg*5、*Abcg*8、*Cyp7a*1、*Scap*、*Nr*1*h*2、*Ppara*、*Pparg* 基因的表达均显著上调，而 *Insig*2 基因的表达则显著下调，提示控食比例超过正常摄食量2/3 以上时，涉及肝脏胆固醇摄取、合成、储存、流出、代谢以及调控胆固醇稳态的基因出现异常表达。研究表明，LDLR 主要介导细胞对低密度脂蛋白的摄取与代谢过程，通过清除血液循环的中密度脂蛋白，降低低密度脂蛋白生成，并介导细胞摄取低密度脂蛋白，以加速其降解，从而维持血浆低密度脂蛋白相对稳定，如果 LDLR 功能异常将导致体内脂代谢紊乱[8]。SRB1 是目前唯一被确认的高密度脂蛋白受体，主要分布于肝脏，它既能与高密度脂蛋白结合，还能与天然的低密度脂蛋白、氧化低密度脂蛋白及乙酰化低密度脂蛋白等结合，主要参与胆固醇的逆向转运，清除外周组织过多的胆固醇，以减缓脂质的沉积，被认为是一种抗动脉粥样硬化分子[9]。HMGCR 是催化细胞内胆固醇从头合成的限速酶，是调控胆固醇代谢的关键酶[10]。本研究结果提示，大幅度控制摄食后小鼠肝脏参与胆固醇摄取、合成及胆固醇的逆向转运的生化过程活跃，导致循环血液中胆固醇的含量下降。

此外，胆固醇 7α羟化 酶(由 Cyp7a1 基因编码)是肝脏胆固醇代谢为胆汁酸的第 1 步限速酶，并受成纤维细胞生长因子 15（FgF15）等分子调控[11]。ATP 结合盒转运体（ABC）家族成员 ATP 结合盒转运体 G1(ABCG5，其基因名为 *Abcg*5)和 ATP 结合盒转运体 G8(ABCG8，其基因名为 *Abcg*8)能够抑制小肠对胆固醇的吸收，增加胆固醇的胆汁分泌，在胆固醇的吸收和胆汁分泌等方面发挥重要作用[12-13]。而 ATP 结合盒转运体 A1(ABCA1，其基因名为 *Abca*1)和 ATP 结合盒转运体 G1(ABCG1，其基因名为 *Abcg*1)主要功能是参与胆固醇的逆向转运过程[14]。核内受体超家族是一类由配体激活的转录因子[15-16]，其中肝脏 X 受体α（LXRα，基因名为 *Nr*1*h*3）、LXRβ、过氧化物酶体增殖剂激活受体（PPAR）等均可通过调节 *Ldlr*、

*Scarb*1 基因的表达来调节胆固醇的代谢，PPARα是临床上常用的贝特类药物的靶点，而 PPARγ参与控制葡萄糖和脂质代谢相关基因的表达，是Ⅱ型糖尿病药物作用的重要靶点，因此，LXRα、LXRβ、PPARα和 PPARγ被认为是调节胆固醇稳态的关键分子。据 Jakulj 等[12]研究结果提示，大幅度控制摄食后小鼠肝脏通过上调 *Abcg5* 和 *Abcg8* 基因的表达以抑制小肠胆固醇的吸收，并通过上调 *Cyp7a*1 基因的表达加速胆固醇转化为胆汁酸代谢过程，同时通过上调 *Nr*1*h*2 和 *Ppara*、*Pparg* 基因的表达主动参与调节胆固醇稳态平衡。

3.3 控制摄食对小鼠肾上腺胆固醇转化的影响

肾上腺是将胆固醇转化为类固醇激素的重要代谢器官，尤其是肾上腺糖皮质激素和盐皮质激素，参与生命体重要的细胞代谢调节过程，而皮质激素合成酶在此过程发挥重要的生化作用[17]。本研究发现，按照正常摄食量 44%及以上比例[1.5~2.0 g/（只·d）]给食后，小鼠肾上腺参与编码胆固醇侧链裂解酶的 *Cyp*11*a*1 基因和皮质激素合成方向酶的基因 *Cyp*21*a*1 的表达均显著上调，提示严格控制摄食后小鼠肾上腺皮质细胞利用胆固醇转化代谢为皮质激素的生化过程处于十分活跃状态；此外，按照正常摄食量的 33%[1.5 g/（只·d）]更严格控制摄食后，*StAR* 基因与 StAR 蛋白以及编码皮质酮合成酶 11β羟化酶 1 的基因 *Cyp*11*b*1 的表达均显著上调，而编码醛固酮合成酶 11β羟化酶 2 的基因 *Cyp*11*b*2 的表达显著下降，提示大幅度严格控制摄食后小鼠肾上腺皮质细胞内胆固醇转运到线粒体内膜的转运过程主动增强，以提供更多的游离胆固醇供线粒体合成类固醇所需，且皮质酮合成过程更活跃，但是醛固酮合成过程被抑制。然而，值得注意的是，仅发现按照正常摄食量 88%和 66%给食的小鼠血清皮质酮含量略下降，并没有呈现与皮质酮合成酶的基因与蛋白表达一致性的趋势，推测皮质酮合成过程可能因被动性代偿而基因表达活跃而皮质酮分泌入血液中的实际含量依然不足，甚至与皮质酮代谢到尿液过程加速有关。

4 结　论

① 超过正常摄食量 1/3 以上的控食比例将影响 ICR 小鼠体重及其脏器，首要损害的是脾脏、胸腺与肝脏，其次是心脏和肾脏，而对性腺组织睾丸影响最小，提示严格控制摄食最先损及免疫和代谢器官，而生殖器官自我保护能力最强，从而不影响繁衍后代。

② 大比例严格控制摄食后，小鼠肝脏参与胆固醇摄取、合成与代谢关键基因表达活

跃，以维持肝细胞胆固醇稳态平衡的基本生物学机制。

③ 严格控制摄食后，胆固醇在肾上腺皮质细胞转化为类固醇激素生化过程活跃，以主动合成皮质激素适应外界不同应激。

参考文献：

[1] 江钟立,张勤,贺丹军,等.肥胖和糖尿病患者的饮食行为学分析[J].中华物理医学与康复杂志,2000,22(6):343–345.

[2] 刘力松,华琦,庞蓓蕾.原发性高血压患者饮食结构与心血管病危险因素[J].中华高血压杂志,2008,16(3):225–229.

[3] 陈名道,李荣英.糖尿病饮食治疗的若干不同观点[J].中华内科杂志,2005,44(10):791–793.

[4] 张俊杰,李亮,柯斌.从肉碱稳态系统探讨饮食失节致脾虚的作用机制[J].时珍国医国药,2016,27(5):1257–1259.

[5] 王庆其.内经选读[M].北京:中国中医药出版社,2007:59–60.

[6] 陈国芳,刘超.限食对代谢性疾病的影响及其相关机制[J].诊断学理论与实践,2016,15(4):346–349.

[7] 谢德娟.限食与高营养对雄果蝇衰老与生殖的作用和机制研究[D].硕士学位论文.西安:陕西师范大学,2008.

[8] ZELCER N,HONG C,BOYADJIAN R,et al.LXR regulates cholesterol uptake through Idol-dependent ubiquitination of the LDL receptor[J].Science,2009,325(5936):100–104.

[9] HEINECKE J W.Small HDL promotes cholesterol efflux by the ABCA1 pathway in macrophages:implications for therapies targeted to HDL[J].Circulation Research,2015,116(7):1101–1103

[10] TALL A R,YVAN-CHARVET L,TERASAKA N,et al.HDL,ABC transporters,and cholesterol efflux:implications for the treatment of atherosclerosis[J].Cell Metabolism,2008,7(5):365–375.

[11] INAGAKI T,CHOI M,MOSCHETTA A,et al.Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis[J].Cell Metabolism,2005,2(4):217–225.

[12] JAKULJ L,VAN DIJK T H,DE BOER J F,et al.Transintestinal cholesterol transport is active

in mice and humans and controls ezetimibe-induced fecal neutral sterol excretion[J].Cell Metabolism,2016,24(6):783–794.

[13] 袁敏,王旻,付文亮,等.SAK-HV 蛋白通过上调 ABCg5/ABCg8 的表达降低胆固醇的吸收[J].医学研究杂志,2015,44(7):17–22.

[14] KENNEDY M A,BARRERAG C,NAKAMURA K,et al.ABCg1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation[J].Cell Metabolism,2005,1(2):121–131.

[15] PEET D J,TURLEY S D,MA W Z,et al.Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXRα[J].Cell,1998,93(5):693–704.

[16] HANKIR M K,SEYFRIED F,HINTSCHICH C A,et al.Gastric bypass surgery recruits a gut ppar-α-striatal d1r pathway to reduce fat appetite in obese rats[J].Cell Metabolism,2017,25(2):335–344.

[17] MILLER W L,AUCHUS R J.The molecular biology,biochemistry,and physiology of human steroidogenesis and its disorders[J].Endocrine Reviews,2011,32(1):81–151.

Effects of Dietary Restriction on Cholesterol Metabolism in Liver and Adrenal Gland of Mice

QIAN Hongliang PAN Zhiqiang WANG Xiaomin LU Tao FANG Zhaoqin

(*Basic Medical School of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai* 201203, *China*)

Abstract: This experiment was conducted to study the effects of dietary restriction on cholesterol metabolism in liver and adrenal gland of mice. ICR male mice were used as the study subjects, with adaptive feeding 3 days. After weighing up to 24 to 25 g, they were randomly divided into 5 groups with 6 mice in each group, including normal control group (free feeding), 4.0 g feeding group [feed intake: 4.0 g/·d per mouse; restriction ratio: 88% of normal feed intake], 3.0 g feeding group [feed intake: 3.0 g/d per mouse; restriction ratio: 66% of normal feed intake], 2.0 g feeding

*Corresponding author, professor, E-mail： pzq527@163.com （责任编辑 菅景颖）

group [feed intake: 2.0 g/d per mouse; restriction ratio: 44% of normal feed intake] and 1.5 g feeding group [feed intake: 1.5 g/ d per mouse; restriction ratio: 22% of normal feed intake]. It was free drinking for all groups. After feeding restriction for 14 days, the mice were executed, and the heart, liver, kidney, spleen, thymus and testis were weighed and the organic indexes were calculated. The total RNA and total protein of hepatic and adrenal tissues were extracted. Then, cholesterol metabolism related genes mRNA relative expression levels were detected by real-time quantitative PCR technology, and steroidogenic acute regulatory protein (StAR) relative expression level was assayed by Western blot method, and serum corticosterone content were tested by enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) method. The results showed as follows: 1) compared with the normal control group, the body weight of mice in dietary restriction groups was lost in different degrees, and the heart, liver, kidney, spleen and thymus of mice in dietary restriction groups were shrunken in different degrees. 2） Compared with the normal control group, the expression of low-density lipoprotein receptor (*Ldlr*), scavenger receptor class B member 1 (*Scarb1*), hydroxymethyl glutaric acyl coenzyme A reductase (*Hmgcr*), hormone-sensitive triglayceride lipase (*Lipe*), apolipoprotein E (*Apoe*), ATP-binding cassette transporter G5 (*Abcg5*), ATP-binding cassette transporter G8 (*Abcg8*), cytochromes P450 7A1 (*Cyp7a1*), sterol regulatory element binding protein cleavage active protein (*Scap*), liver X receptor β (*Nr*1*h2*), peroxisome proliferators-activated receptor α (*Ppara*) and peroxisome proliferators-activated receptor γ (*Pparg*) genes in liver of 3.0 g feeding group, 2.0 g feeding group and 1.5 g feeding group were significantly up-regulated (P<0.05 or P＜0.01), while the expression of insulin induced gene 2 (*Insig2*) gene was significantly down-regulated (P<0.05). 3) Compared with the normal control group, the expression of adrenal cytochromes P450 11A1 (*Cyp11a1*) and cytochromes P450 21A1 (*Cyp21a1*) genes in adrenal gland of 2.0 g feeding group and 1.5 g feeding group were significantly up-regulated (P<0.05), the expression of *StAR* and cytochromes P450 11B1 (*Cyp*11*b*1) genes in adrenal gland of 1.5 g feeding group were significantly up-regulated (P<0.05), and the expression of cytochromes P450 11B2 (*Cyp*11*b*2) in 3.0 g feeding group, 2.0 g feeding group and 1.5 g feeding group was significantly down-

regulated ($P<0.05$). Additionally, the adrenal StAR protein expression of all dietary restriction groups was strengthen, and it was strengthen with the feed intake decreasing. In conclusion, the organism metabolism such as spleen, thymus and liver are affected by extreme dietary restriction, and then the hepatic and adrenal cholesterol metabolism and conversion are affected.

Key words: dietary restriction; mice; liver; adrenal gland; cholesterol metabolism;